

## 明 細 書

## ローヤルゼリーペプチドおよびこれを含有する組成物

5

## 技術分野

この出願の発明は、ローヤルゼリーペプチドおよびこれを含有する組成物に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、女王蜂の誘導補助因子としての機能を有し、また動物の生体防御系の向上（免疫力の賦活効果）を実現することのできるローヤルゼリーペプチドおよびこれを含有する組成物に関するものである。

10

## 背景技術

ミツバチの生産物として、蜂蜜やローヤルゼリーがよく知られている。特にローヤルゼリーは、そのほとんどが糖質である蜂蜜とは異なり、三大栄養素であるタンパク質、糖質、脂質をはじめ、各種ビタミン、ミネラル等をバランスよく、しかも豊富に含んでいる。ローヤルゼリーは、女王蜂への誘導効果だけでなく、ヒトを含む動物に対して、疲労回復、アレルギー、感染症や癌等に有効であるといったさまざまな効果を有しているとされている。

15

そのため、ローヤルゼリーをミツバチの幼虫に人為的に与え、この幼虫を女王蜂へ分化誘導させることが考慮されている。これにより、女王蜂の室内人工飼育が可能となり、計画的にミツバチ生産することが期待できるが、このような女王蜂の室内人工飼育は困難であることが実情である。

20

また、一方、ヒトにおいては、多くの食品分野等で注目されているため、健康食品の一種として活用されている。しかしながら、上記のようなローヤルゼリーの幅広い効果は、明確に科学的な立証がなされているとはいえないのが実情である。

25

そこで、係る問題を解決するため、ローヤルゼリーに関する研究が盛んに行なわれている。第1には、女王蜂の室内人工飼育を実現するために、女王蜂への分化導方法が提案されている（特開平 5-76253 号公報）。上記のとおりミツバチに

におけるローヤルゼリーの効果として、ミツバチの幼虫を女王蜂へ分化誘導する作用を有することが知られているが、この作用を有する蛋白性物質を抽出および精製し、ミツバチの幼虫に与えることにより、効率よく幼虫を女王蜂に分化誘導することができる。この提案の方法により、ミツバチの女王蜂の室内人工飼育が可能となり、計画的にミツバチ生産を行うことができるとしている。

一方、第2には、ローヤルゼリーが有する幅広い効能を解明するための研究も多くなされている。たとえば、ローヤルゼリーを構成する成分であるタンパク質やペプチド等を同定し、それぞれを機能解析することが行なわれている。たとえば、主要タンパク質1～5（MJR1～5）の報告がなされており、特にMJR3は、免疫応答を促進することが開示されている（Okamoto, I., et al., Life Sciences, 73, p2029-2045, 2003）。また、アピシンが細胞の成長を促進する等の可能性を示唆している報告もあり（米倉正実、ミツバチ科学、19巻、1号、15-22頁、1998年および Yonekura, M., New Food Ind., 41(1), p1-8, 1999）、ロイヤリシンが抗菌性を有することが開示されている報告（Fujiwara, S., et al., J. Biol. Chem., 265(19), p11333-7, 1990）等もある。また、最近では、ローヤルゼリーの構成成分の一つとしてアピシミンが同定された（Bilikova, K., et al., FEBS Letters, 528, p125-129, 2002）。

しかしながら、女王蜂への分化誘導方法として例示した、上記特許文献1提案の方法の場合では、この提案で用いられている分化誘導因子をローヤルゼリーから抽出することは、有機溶媒や限外濾過等の煩雑な手順を行う必要があるという問題があった。

また、現在、同定されているローヤルゼリーに含まれる機能性物質は、上記のMJR1～5、アピシン、ロイヤリシンおよびアピシミンのみであり、その機能性について詳細に解明されていないのが現状である。特に、最近発見されたアピシミンについては、どのような生理作用等の機能を有しているのか、その機能性については全く解明されていない。

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、従来の問題点を解消し、女王蜂への分化誘導補助因子としての機能を有し、また動物の生体防御系の向上（免疫力の賦活効果）を実現することのできるロー

ヤルゼリーペプチドおよびこれを含有する組成物を提供することを課題としている。

### 発明の開示

- 5      この出願の発明は、上記の課題を解決する手段として、以下の (1) から (11) の発明を提供する。
- (1) 女王蜂分化誘導補助因子としての機能および動物の免疫力賦活因子としての機能の少なくともいずれかの機能活性を有することを特徴とするローヤルゼリーペプチド。
- 10    (2) 上記 (1) のローヤルゼリーペプチドをコードする遺伝子配列を有する発現カセットを備えた発現ベクター。
- (3) 上記 (2) の発現ベクターによって、形質転換された形質転換細胞。
- (4) 上記 (3) の形質転換細胞から産生されるローヤルゼリーペプチド。
- (5) 上記 (1) または (4) のローヤルゼリーペプチドを有効成分として含有する組
- 15    成物であって、ミツバチの女王蜂誘導補助効果を向上させる機能および動物の免疫力賦活効果を向上させる機能の少なくともいずれかの機能を有することを特徴とする組成物。
- (6) 上記 (5) の組成物をミツバチの幼虫に投与することにより、幼虫の成長を促進し、女王蜂への分化を誘導させることを特徴とするミツバチの女王蜂への誘導
- 20    方法。
- (7) 上記 (5) の組成物を動物に投与することにより、動物の免疫力賦活効果を向上させることを特徴とする動物の免疫力賦活方法。
- (8) 上記 (1) のローヤルゼリーペプチドをコードする遺伝子配列を導入した非ヒト生物の初期胚、受精卵および胚幹細胞いずれかを個体発生して得られる非ヒト
- 25    生物およびその子孫生物であって、体細胞染色体中に上記遺伝子を保有し、ローヤルゼリーペプチドを発現することを特徴とするトランスジェニック生物。
- (9) 非ヒト生物が、植物または動物のいずれかであることを特徴とする (8) の非ヒト生物。
- (10) 動物が、昆虫類であることを特徴とする (9) の非ヒト生物。

(11) 昆虫類が、カイコであることを特徴とする(10)の非ヒト生物。

そして、以上のとおりのこの出願の発明によって、次の効果を得ることができる。

5 上記(1)記載の発明のローヤルゼリーペプチドによれば、ミツバチの幼虫を女王蜂へ人為的に誘導補助することができ、また動物の免疫力を賦活することができる。

上記(2)記載の発明の発現ベクターによれば、ローヤルゼリーペプチドをコードする遺伝子配列を有する発現ベクターとすることにより、保存性および取り扱い性が向上する。

10 上記(3)記載の発明の形質転換細胞によれば、安定、かつ、簡便にローヤルゼリーペプチドを発現させることができる。

上記(4)記載の発明のローヤルゼリーペプチドによれば、上記(1)記載の発明と同様の効果が得られ、しかも、このローヤルゼリーペプチドは、投与対象の動物と同じ由来とする形質転換細胞から産生させることができるため、免疫原性を抑制することができる。

15 上記(5)記載の発明の組成物によれば、上記(1)または(4)記載の発明の効果に加え、各種の薬理成分等と混合、また糖衣加工やカプセル封入体等の加工等を実施することにより、ローヤルゼリーペプチドを有効成分として含有する組成物を摂取しやすくすることができる。

20 上記(6)記載の発明の女王蜂への誘導方法によれば、女王蜂の室内人工飼育が可能となり、計画的にミツバチ生産を行うことを実現することができる。

上記(7)記載の発明の動物の免疫力賦活方法によれば、投与されたヒトを含む動物の免疫防御系の働きを向上させることが可能となる。

25 上記(8)記載の発明のトランスジェニック生物によれば、高生産性、耐病性、耐熱性、耐寒性等の多くの生理機能がより活性化および増強化された生物を得ることができる。

上記(9)記載の発明の非ヒト生物によれば、上記(8)記載の発明と同様の効果が得られ、より高い効果が得られることを可能とする。

上記(10)記載の発明の非ヒト生物によれば、上記(8)および(9)記載の発明と同

様の効果が得られ、さらに高い効果が得られることを可能とする。

上記 (11) 記載の発明の非ヒト生物によれば、カイコは、飼育方法をはじめとする知見が豊富なため、より効果的にローヤルゼリーペプチドの効果を有するトランスジェニック生物として得ることができる。

5

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、ローヤルゼリー粉末からローヤルゼリーペプチドを抽出するプロトコールの概略を例示した図である。

10 図 2 は、この出願の発明のローヤルゼリーペプチドの高速液体クロマトグラフィー溶出パターンとそのピーク時（矢印箇所）における SDS-PAGE による解析をそれぞれ例示した図である。

図 3 は、この出願の発明のローヤルゼリーペプチドの N 末端におけるアミノ酸を例示した図である。

15 図 4 は、この出願の発明のローヤルゼリーペプチドの塩基配列とそのアミノ酸を例示した図である。

図 5 は、セイヨウミツバチのゲノム DNA をサザンブロット法により解析した結果を示した写真図である。

図 6 は、働きバチの total RNA をノーザンブロット法により解析した結果を示した写真図である。

20 図 7 は、この出願の発明のローヤルゼリーペプチド遺伝子の構築の際に使用したフラグメント 1 から 8 の塩基配列を例示した図である。

図 8 は、組換えローヤルゼリーペプチドの高速液体クロマトグラフィー溶出パターンとそのピーク時（水平バー）における SDS-PAGE による解析結果をそれぞれ例示した図である。

25 図 9 は、マウス脾臓由来のリンパ球細胞の増殖に及ぼす組換えローヤルゼリーペプチドの効果を例示した図である。

図 10 は、抗ローヤルゼリーペプチド抗体を用いて、ローヤルゼリーペプチドの合成器官が下咽頭腺であることを示した写真図である。

## 発明の実施のための最良の形態

この出願の発明は上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態について説明する。

- この出願のローヤルゼリーペプチドは、ミツバチが生産するローヤルゼリーの成分の一つであり、「アピシミン」として報告され (Bilikova, K., et al., FEBS Letters, 528, p125-129, 2002)、これをコードする遺伝子の配列についても開示されている (GenBank Accession No. AAQ16586, GenBank Accession No. AY340960)。
- しかしながら、その機能に関しては解明されていないため、この出願の発明は、発明者らの鋭意研究の結果に基づいてなされたものである。すなわち、この出願の発明のローヤルゼリーペプチドは、ミツバチの幼虫に投与することにより、その幼虫を女王蜂へと分化誘導する女王蜂分化誘導補助因子としての機能を有し、また、ヒトを含む動物に投与することにより、その動物の免疫力を向上させる免疫力賦活因子としての機能をも有することを解明したことに基づいていてなされたものである。これにより、ミツバチの幼虫を女王蜂へ人為的に誘導することもでき、また動物の免疫力を簡便に向上させ、感染症等の病気に対する抵抗力および回復力を強くすることも可能となる。

- 従来のようにローヤルゼリーから、有機溶媒を用いた抽出や限外濾過等の公知の抽出方法や精製方法によって、この出願の発明のローヤルゼリーペプチドを製造することもできるが、この出願の発明のローヤルゼリーペプチドは、遺伝子工学的な方法を用いて製造することができるため、好ましい。具体的には、たとえば、ローヤルゼリーペプチドをコードする遺伝子配列 (たとえば、GenBank Accession No. AAQ16586, GenBank Accession No. AY340960 等) を有した発現カセットを備えた発現ベクターを大腸菌や酵母、植物細胞、動物細胞等に公知の方法である、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、マイクロインジェクション法等に従い導入することによって、大量、かつ、簡便に製造することができる。しかも、この形質転換された大腸菌や酵母、植物細胞、動物細胞等の菌体・細胞から回収したローヤルゼリーペプチドは高純度で収率良く、精製することができる。さらに、この発現カセットに、たとえば、6×ヒスチジンタグ (His)、FLAG、 $\beta$ -ガラクトシターゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、

c-myc、マルトース結合タンパク質 (MBP) 等をコードする配列をタグ配列として含ませることにより、精製しやすくなる。

この出願の発明における「発現ベクター」は、ローヤルゼリーペプチドをコードする遺伝子配列を有する発現カセットをベースベクター内に挿入結合することによって作製することができる。したがって、発現カセットは、ベースベクターの任意のクローニングサイトに対応した制限酵素配列を有することが好ましい。「ベースベクター」は、たとえば動物細胞用ベクター、昆虫細胞用ベクター、酵母用ベクター、大腸菌用ベクター、また酵母・大腸菌等といった複数種用のシヤトルベクター等の種々のベースベクターがあるが、これらベースベクターは宿主細胞や目的に応じて適宜に選択することができる。また、適当な宿主細胞で外来タンパク質を発現させるための既存のベクターDNA を一部改変して使用することもできる。たとえば、宿主細胞として大腸菌等の微生物を利用する場合には、オリジン、プロモータ、ターミネータ等を有する pUC 系、pBluescriptII や pET 系システム等が使用することができる。

この発現ベクターを導入する際に利用する細菌や細胞 (受容体) は、ローヤルゼリーペプチドを安定に発現することのできるものであれば、特に限定されるものではなく、たとえば、大腸菌や酵母類、各種植物細胞、各種動物細胞等を使用することができる。このように形質転換の対象とする細胞の種類を任意に選択および使用することができるため、ローヤルゼリーペプチドの投与の対象となるヒトを含めた動物の由来に合わせて、形質転換する細胞の由来や種類を適宜に選択することにより、免疫原性を抑制することができる。

また、この出願の発明は、上記の特徴を有するローヤルゼリーペプチドを有効成分として含有する組成物を提供する。すなわち、この組成物は、ミツバチの幼虫を女王蜂へと分化誘導する機能を有し、また、ヒトを含む動物の免疫力を向上させる機能を有している。この組成物は、薬理成分あるいは食品成分等と混合、加工することにより、投与あるいは摂取しやすい、製剤や機能性食品とすることができる。食品成分の一種である各種ビタミン類や各種ミネラル分等の生体にとって有益、かつ、この出願のローヤルゼリーペプチドの効果を維持することのできる物質であれば、特に限定されずに混合、加工することができる。

なお、「薬理成分」とは、一般に薬剤製造に利用される各種の担体であり、担体は薬剤の種類や注射や経口等の投与形態等に応じて、適宜に選択できる。たとえば、懸濁剤やシロップ剤等のような経口液体状の薬剤は、水、シュクロース等の糖類、ポリエチレングリコール等のグリコール類、ごま油や大豆油等の油類、  
5 その他、防腐剤、ペパーミント等の各種フレーバー類等を使用して製造することができる。また、散剤や丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース等の賦形剤、デンプン等の崩壊剤、マグネシウムステアレート等の潤沢剤、また各種結合剤や表面活性剤、可塑剤等を用いて製剤化することができる。

- 10 上記組成物を、ミツバチの幼虫に餌等として、摂取させることにより、人為的に女王蜂へと分化誘導することができる。その結果、従来困難であった、女王蜂の室内人工飼育が可能となり、計画的にミツバチを生産し、ローヤルゼリーや蜂蜜等を効率よく取得することを実現することができる。また、ヒトを含む動物に上記組成物を投与、あるいは、摂取させることにより、免疫力が活性および増強  
15 させることができ、その結果、各種病気に対する抵抗力および回復力が高まり、健康を維持することを期待することができる。

- さらにこの出願の発明は、ローヤルゼリーペプチドをコードする遺伝子配列を導入した非ヒトのトランスジェニック生物を提供する。このトランスジェニック生物は、生物の初期胚、受精卵および胚幹細胞（ES 細胞）いずれかを個体発生させて得られる非ヒト生物およびその子孫生物であり、体細胞染色体中に上記のローヤルゼリーペプチドをコードする遺伝子配列を保有し、ローヤルゼリーペプチドを発現することを特徴としている。このトランスジェニック生物は、まず動物の場合は、たとえば、公知のトランスジェニック動物作製法（たとえば、Gordon, JW. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, p7380-7384, 1980）に従って作  
20 製することができる。すなわち、機能遺伝子（この出願におけるローヤルゼリーペプチドをコードする遺伝子）を初期胚、受精卵および胚幹細胞等の分化全能性細胞に導入して、この細胞を個体へと発生させ、体細胞のゲノム中に外来性の機能遺伝子が組み込まれた個体を選別して、目的とするトランスジェニック動物を作製することができる。
- 25



この「機能遺伝子の導入」とは、外来性の機能遺伝子を上記の形質転換動物作製法により、機能遺伝子を染色体ゲノム中に導入する。また、公知である標的遺伝子組換え法（ジーンターゲティング法）（Capecchi, MR, et al., Science, 244, p1288-1292, 1989）を利用すれば、内在性の機能遺伝子と置換させることによって外来性の機能遺伝子を導入することもできる。なお、外来性の機能遺伝子は、その生物の染色体ゲノムに元来存在しない遺伝子であり、他の生物種由来の遺伝子や PCR 等で作製した合成遺伝子等である。

なお、ES 細胞は、マウス、ラット、ウサギ、サル等にて確立されており、また、ブタ等においては、EG (embryonic germ) 細胞が確立されているため、対象の動物種とすることができる。

植物の場合は、アグロバクテリウムツメファシエンスの感染時に起こる Ti プラスミド中の t-DNA の植物細胞への移行と染色体組込みをを利用した方法（特に、双子葉植物において好適）やプロトプラストへのエレクトロポレーション法等による DNA の直接導入法（特にイネ等の単子葉植物に好適）等を利用することにより、機能遺伝子（ローヤルゼリーペプチドをコードする遺伝子）を導入することができる。

上記のようなトランスジェニック動物、あるいは植物により、耐病性、耐候性、耐寒性、耐熱性等、種々の機能が增強された生物を得ることができ、さらにイネ等の作物である植物においては、その生産性の向上を期待することができ、家畜や農作物に活用することができる。

さらにまた、トランスジェニック動物における動物が、昆虫類であることが好ましく、昆虫類が、飼育方法等の知見が豊富に蓄積されているカイコであることが、効率性の高さや扱い易さ等の観点からさらに好ましい。

以下に実施例を示し、さらに詳しく、この出願の発明について説明する。もちろん、以下の例によってこの出願の発明が限定されることはない。

## 実施例

### 実施例 1：ローヤルゼリーペプチドの抽出

乾燥粉末状のローヤルゼリーから、図 1 に例示した抽出手段により、目的とす

- るローヤルゼリーペプチドを含む粗画分を抽出した。すなわち、乾燥粉末状のローヤルゼリーを冷却したアセトンにて洗浄し、その溶液を 2500×g にて 30 分間遠心処理を行なった。沈殿物を回収し、80%エタノールで洗浄し、10000×g にて 20 分間の遠心処理を行なった。再び、沈殿物を回収し、2%の NaCl を用いて抽出
- 5 操作を行ない、10000×g にて 20 分間の遠心処理を行ない、結晶化操作 (MWC0:500) を行なうことにより、目的とするローヤルゼリーペプチドを含んだ粗画分を得た。

### 実施例 2：ローヤルゼリーペプチドの単離

- 実施例 1 で得たアピシミンの粗画分を、高速液体クロマトグラフィーにより、
- 10 アセトニトリル濃度 96%を用いて溶出するピークが、単一のローヤルゼリーペプチドとして単離した。

- 図 2 は、ローヤルゼリーペプチドの高速液体クロマトグラフィーにおける溶出パターンを示したものである。図 2 に示したとおり、ローヤルゼリーペプチドを含んだ粗画分を TSK-gel ODS-80Ts による逆相高速液体クロマトグラフィーで示
- 15 している矢印箇所（ピーク）を、トリシン SDS-PAGE により、分析した結果、単一のローヤルゼリーペプチドとして単離（6.2kDa）することができた。

### 実施例 3：ローヤルゼリーペプチドの部分的なアミノ酸配列の決定

- 実施例 2 で単離したローヤルゼリーペプチドの一次構造を全自動タンパク質
- 20 一次構造分析装置（プロテインシーケンサー）（G-1000A、Hewlett Packrd 社製）にて分析し、公知技術のエドマン分解法による N-末端側からのアミノ酸配列の決定を行なった。その結果、図 3 に例示したとおり、N 末端側から第 47 番目のアミノ酸が不明の 54 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を決定することができた（配列番号 14 および配列番号 15）。

- 25 なお、ローヤルゼリーペプチドの分子質量を測定も行なった（図示せず）。この測定には、質量分析計である MALDI-TOF MS システム Voyager RP（登録商標）（PerSeptive Biosystem 社製）を用いた。測定は、50%アセトアニトリルに飽和させた  $\alpha$ -cynao-4-hydroxycinnamic acid ( $\alpha$ -CHCA) を陽イオン化マトリックスとして用い、分子量マーカーである Calibration Mixture 2 (ACTH (7-38 clip)、

insulin (bovine)) と 0.1%TFA に溶解したペプチドをプレート上で混合して、風乾させた後レーザー照射を行なって、分子質量を得た。

#### 実施例 4 : ローヤルゼリーペプチドをコードする cDNA 全長の決定

##### 5 <1>ミツバチの飼育方法

セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) (盛岡市、藤原養蜂場から供与) の下咽頭腺(ローヤルゼリーのタンパク質産生器官)から、公知の方法(たとえば、Sambrook, J., et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等)に従い、ポリ A+RNA を抽出した。

- 10 なお、このセイヨウミツバチは、セイヨウミツバチ用巣箱(可動式巣枠)を用いて、岩手大学農学部附属植物園内で野外飼育した。秋期の花密が不足する時期には、食用の砂糖と水(1:1の割合)とを混合した餌を与えた。また、害敵であるミツバチヘギイタダニ(*Varrora jacobsoni*)の対策に、防ダニ剤のアピスタン(三菱化学社製)を用いた。冬期は、群生維持のため巣箱を発泡スチロールで囲
- 15 った。さらに、羽化直後の働きバチの胸部にエナメル塗料でマーキングして、これを指標として下咽頭腺の発達が盛んである6から10日齢の働きバチ(育児蜂)を採集して用いた。

##### <2>下咽頭腺の摘出

- 働きバチを氷上で冷麻酔し頭部を集め、頭部から冷蜂用生理食塩水
- 20 (0.02% (w/v) の KCl、2.02% (w/v) の  $\text{CaCl}_2$ 、0.4% (w/v) のサッカロース、0.9% (w/v) の NaCl) 中で、下咽頭腺を摘出した。

##### <3>Total RNA の調整

###### (a) Total RNA の抽出

- Total RNA の抽出は、QuickPrep(登録商標) Total RNA Extraction Kit (Amersham
- 25 Pharmacia Biotech 社製) を用い、添付されているプロトコールに従い下咽頭腺 53mg から Total RNA を抽出し、エタノール沈殿後に滅菌水 200  $\mu\text{l}$  に溶解した。そして、その一部を分光光度計で波長  $A_{260}$  を測定し濃度を算出した。

###### (b) poly A<sup>+</sup> RNA の単離

得られた Total RNA の 500  $\mu\text{g}$  から、Oligotex-dt30<Super> (宝酒造社製) を

使用して、添付されているプロトコールに従い poly A<sup>+</sup> RNA を単離した。この poly A<sup>+</sup> RNA の濃度測定には、上記 (a) と同様の方法で行なった。

#### <4>Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) を利用したローヤルゼリーペプチドのクローニング

##### 5 (a) cDNA の合成

Marathon (登録商標) cDNA amplification Kit (CLONTECH 社製) を用い、添付のプロトコールに従い RACE 法を実施した。上記<3> (a) および (b) により得られた poly A<sup>+</sup> RNA 1 $\mu$ g を、Marathon cDNA Synthesis Primer (TTCTAGAATCAGAGGAAGAT<sub>(30)</sub>N<sub>1</sub>N) とともに滅菌水中で 70℃、10 分間反応させた後、氷上で急冷した。

- 10 この反応液を 10nmol の dNTP、100units の MMLV Reverse Transcriptase (Superscript (登録商標) II, Gibco BRL 社製) を含む First-strand Buffer 10 $\mu$ l 中で 72℃、1 時間反応させ、1 本鎖 cDNA を合成した。

- さらに、反応液を 10nmol の dNTP、Second-strand Enzyme Cocktail (24units E. coli DNA Polymerase I、0.8units E. coli DNA Ligase、1unit E. coli RNaseH) 15 を含む Second-strand Buffer (100mM KCl、10mM Ammonium Sulfate、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.15mM  $\beta$ -NAD、20mM Tris (pH 7.5)、0.05mg/ml BSA) 80 $\mu$ l 中で 16℃、1.5 時間反応させた。反応後、10units の T4 DNA Polymerase を加え、16℃で 45 分間反応させて 2 本鎖 cDNA を合成した。

- 20 この 2 本鎖 cDNA をフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) にて抽出し、さらにクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) で抽出した。この抽出液を、1/2 量の 4M 酢酸ナトリウムおよび 2.5 倍量のエタノールにて、cDNA を沈殿させ、80%エタノールで洗浄した。

##### (b) アダプター結合

- 25 2 本鎖 cDNA の沈殿物を滅菌水に溶解し、Marathon cDNA Adaptor および 1unit の T4 DNA Ligase を含む DNA Ligation Buffer (50mM Tris-HCl (pH 7.8)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、1mM ATP、5% Polyethylene Glycol (MW:8000)) 10 $\mu$ l 中で 16℃、終夜反応させた。このアダプターを結合させた cDNA を TE buffer (40mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA (pH 8.0)) で 50 倍希釈したものを鋳型として 3' RACE および 5' RACE を行なった。

## (c) 3' RACE

ローヤルゼリーペプチドのアミノ酸配列のN末端部分に対応する塩基配列を推定し、これを基に配列番号1に示した、3' RACE に用いる degenerate センスプライマー (AARACNWSNATHWSNGTNAARGGNGARWSNAAYGTNG の 37 塩基であり、以下プライマー1 とする) を設計し、日本遺伝子研究所にて合成した。なお、このプライマー中の「A」はアデニン、「C」はシトシン、「G」はグアニン、「T」はチミンおよび「I」はイノシンをそれぞれ示している。また、「R」はアデニンまたはグアニン、「W」はアデニンまたはチミン、「S」はシトシンまたはグアニン、「H」はアデニンまたはシトシンまたはチミン、「Y」はシトシンまたはチミンを示している。

- 10 このプライマー1 は、TE buffer で 100pmol/ $\mu$ l の濃度となるように希釈して使用した。3' RACE 反応は、上記の (IV) (b) でアダプター結合した cDNA を鋳型として、プライマー1、Marathon cDNA Adaptor と特異的に結合する AP1 primer および AmpliTaq Gold (登録商標) (PERKIN ELMER 社製) を用いた。10nmol dNTP、10pmol AP1 primer、100pmol プライマー1 および 2.5units の AmpliTaq Gold (登録商標)
- 15 を含む PCR buffer 50 $\mu$ l 中にアダプター結合した cDNA を加えて、サーマルサイクラー (Gene Amp PCR SYSTEM 9700、PERKIN ELMER 社製) を用いて、次の条件のもとで PCR 反応を行なった。すなわち、(1) 95 $^{\circ}$ C、10 分間 (熱処理)、(2) 94 $^{\circ}$ C、1 分間 (熱変性)、(3) 72 $^{\circ}$ C、1 分間 (アニーリング)、(4) 72 $^{\circ}$ C、1 分間 (伸長) を 3 サイクル行い、以降ステップ (3) のア
- 20 ニーリング温度を 68 $^{\circ}$ C、64 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、56 $^{\circ}$ C と下げ、各 3 サイクル行なった。そして、最後にアニーリング温度を 52 $^{\circ}$ C にし、25 サイクル反応させ、72 $^{\circ}$ C で 7 分間の伸長反応を加えた。

なお、図には示していないが、アガロース電気泳動を行なうことにより、この PCR 産物の確認も行なっている。

## 25 (d) PCR 産物のサブクローニング

上記<4>(c)により得られた PCR 産物の塩基配列を決定するため、Original TA Cloning Kit (Invitrogen 社製) を用いて、添付のプロトコールに従い、PCR 産物のサブクローニングを行なった。概要としては、Taq ポリメラーゼの活性を利用して、PCR 産物の 3' 末端にアデニンを付加させ、この PCR 産物を、1 個のチ

ミンが突出しているプラスミドベクターpCR2.1に挿入結合した。

PCR産物は、既存の方法であるアガロースゲル電気泳動を行なった後、UVトランスイルミネーター (AE-6991CX、ATTO社製) 上で波長312nmにて、可視化され、目的のPCR産物のバンド部分を切り出して、DNA回収用フィルター付き遠心チューブである SUPREC-01 (登録商標) (宝酒造社製) を用いて、PCR産物を回収した。

回収されたPCR産物の一部 (3.5  $\mu$ l) を、6mM Tris-HCl (pH 7.5)、6mM MgCl<sub>2</sub>、5mM NaCl、100  $\mu$ g/ml BSA、7mM  $\beta$ -mercaptoethanol、100  $\mu$ M ATP、2mM DTT、1mM spermidine、4.0 weiss units T4 DNA Ligase および 50ng の pCR2.1 プラスミドベクターを含む溶液 10  $\mu$ l 中で、14°Cで一晩反応させ、PCR産物を pCR2.1 プラスミドベクターに連結させた。このベクターを Original TA Cloning Kit に添付のコ

10  
ンピテントセル (INV- $\alpha$  F' One Shot Cell) を形質転換させた後、X-Gal とカナマイシンを塗布した LB アガープレートに接種・塗布し、37°C、一晩培養して、カラーセレクションを行なった。

そして、白いコロニーを選択して、インサートチェックを行なった。すなわち、

15  
コロニーを爪楊枝等で突き、4nmol dNTP、4pmol AP1 primer、40pmol プライマー-1 および 1unit の AmpliTaq Gold (登録商標) を含む PCR 反応液 20  $\mu$ l 中に挿入して爪楊枝先端に付着したコロニーを洗浄した。そして、上記<4>(c)と同様の条件でPCR反応を行い、電気泳動にて泳動パターンを確認した。

この結果から、予想される分子量のPCR産物が含まれていることが確認できた

20  
コロニーを、2 $\times$ YT Broth (1% (W/V) NaCl、1.6% (W/V) トリプトン、1% (W/V) yeast extract) 中に植菌し、37°C、205rpm で8時間振盪培養を行った。

#### (e) プラスミド抽出

2 $\times$ YT Broth で培養した大腸菌から、1MagExtractor-Plasmid-kit (東洋紡社製) を用いて、添付のプロトコールに準じて、磁性ビーズにDNAを吸着させることで

25  
プラスミドを抽出した。

#### (f) DNA シーケンス

上記<4>(e)によって得られたプラスミド 1.5  $\mu$ g と Texas-Red で標識された M13 (-20) リバースプライマー (Thermo Sequenase pre-mixed cycle sequencing kit: Amersham Pharmacia Biotech 社製) と滅菌水を混合し、A、C、G、T の各塩

基を含む溶液 (Thermo Sequenase fluorescent labeled cycle sequencing kit: Amersham Pharmacia Biotech 社製) に加え、次の条件の下でシーケンス反応を 25 サイクル行なった。すなわち、(1) 95℃、3 分間 (熱処理)、(2) 95℃、1 分間 (熱変性)、(3) 50℃、45 秒間 (アニーリング)、(4) 72℃、1 分 30 秒間 (伸長)、(5) 72℃、1 分間 (伸長反応)、で反応を行なった。この反応液に 2×ローディングダイを添加してアスピレーターで濃縮したものを、3μl ずつ DNA オートシーケンサー (SQ-5500、日立製作所社製) にロードして、塩基配列の解析を行なった。

(g) 5' RACE

- 10 3' RACE により得られたローヤルゼリーペプチドの塩基配列情報を基にして、5' RACE 用の GeneSpecific アンチセンスプライマーを 2 種類設計し、作製した。すなわち、この 2 種類のプライマーは、3' RACE により得られた配列と一部重複領域を有するように設計したプライマー2 (配列番号2) および 3' 末端側の塩基配列を基に cDNA 全長の塩基配列の取得を意図したプライマー3 (配列番号3) である。

15 なお、5' RACE の方法および条件は、上記 (IV) (c) の例示の 3' RACE と同一の方法および条件で行なった。ただし、プライマー1 をプライマー2、または、プライマー3 に換えて、5' RACE の反応を行なった。得られた PCR 産物は、上記<4> (d) から (f) と同一の方法で、サブクローニングおよび塩基配列の解析を行なった。

- 20 上記<4> (c) および (g) に示した 3' RACE および 5' RACE により、図4に例示したように、ローヤルゼリーペプチドの全長 cDNA の塩基配列を決定した (配列番号16 および配列番号17)。これに伴い、実施例3の時点では未同定だった第47番目のアミノ酸が、ロイシンであることが判明した。なお、図中において、イタリック体は「シグナル配列」、矢印は「開始点」、\*印は「終止コドン」、下線は
- 25 「図3のN末端アミノ酸配列と同一箇所」、□は「ポリアデニレーションシグナル」をそれぞれ示している。

上記の結果から、この出願の発明のローヤルゼリーペプチドは、アピシミン (Bilikova, K., et al., FEBS Letters, 528, p125-129, 2002) であることが確認された。

(h) La Taq ポリメラーゼを使用した PCR 反応に塩基配列の確認

3' RACE および 5' RACE に用いた Taq ポリメラーゼの AmpliTaqGold (登録商標) は、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性がないため、440 塩基に 1 回の割合で、読み誤りが生じる可能性がある。そのため、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する

- 5 LA-Taq (宝酒造社製) を用いた PCR 反応を行い、読み謝りの可能性を極力減らし、この出願の発明のローヤルゼリーペプチドの塩基配列を確認した (図示せず)。

なお、反応は、20nmol dNTP、125nmol MgCl<sub>2</sub>、10pmol AP1 primer、100pmol プライマー3 および 2.5units LA-Taq を含む反応液 50 μl 中に、アダプター結合 cDNA を鋳型として加えたものを、(1) 94℃、30 秒間 (熱変性)、(2) 50℃、30 秒間  
10 (アニーリング)、(3) 72℃、1 分 30 秒間 (伸長)、(5) 72℃、1 分間 (伸長反応) を 25 サイクル行ない、上記<4> (f) と同様に DNA シークエンサーを用いて塩基配列の確認を行なった。

(i) コンピュータによる解析

- 15 相同性の検索は、BLAST を利用した。開始コドンの位置の推定は、ORF Finder を利用した。

実施例 5 : ローヤルゼリーペプチド (アピシミン) 遺伝子の解析

<1>サザンプロット法

- 20 セイヨウミツバチのゲノム DNA を用いて、公知の方法であるサザンプロット法を利用して、ローヤルゼリーペプチドの遺伝子の解析を行なった。

その結果、図 5 に例示したように、ローヤルゼリーペプチド (アピシミン) の遺伝子は、2 つのイントロンを有する class II 遺伝子の特徴を示し、ハプロイドゲノムあたり 1 コピーであることを判断することができた。

- 25 なお、図中のレーン「BamH I」は制限酵素 BamH I 処理したサンプル、レーン「Hind III」は制限酵素 Hind III 処理したサンプル、「Pst I」は制限酵素 Pst I 処理したサンプル、「Xho I」は制限酵素 Xho I 処理したサンプルをそれぞれ示している。

<2>ノーザンプロット法

また、ノーザンプロット法により、セイヨウミツバチの日齢 (ステージ) およ



び器官とローヤルゼリーペプチドの遺伝子発現との関係を解析した。その結果、図6に例示したように、働きバチにおいても育児蜂から採餌蜂へと分化した下咽頭腺で強く発現していることを確認した。

なお、レーン1から6は、羽化後7日の働きバチ（育児蜂）から10 $\mu$ gの total RNA を抽出したものであり、それぞれ頭部、胸部、腹部、脳、下咽頭腺および大顎腺を示している。また、レーン7は羽化後0日の下咽頭腺、レーン8は羽化後7日の下咽頭腺、レーン9は羽化後30日の働きバチ（採餌蜂）の下咽頭腺からそれぞれ抽出した10 $\mu$ gの total RNA である。

## 10 実施例6：ローヤルゼリーペプチド（アピシミン）の発現システム

公知の方法（たとえば、Sambrook, J., et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等）に従い、この出願のローヤルゼリーペプチドの遺伝子を大腸菌に導入して、大量発現系を構築し、組換えローヤルゼリーペプチドとして発現を行った。

### 15 <1>ローヤルゼリーペプチド遺伝子の構築

本実施例に用いたローヤルゼリーペプチド遺伝子は、大腸菌の使用頻度の高いコドンを参考に塩基配列を設計し、これを基に図7に例示したとおりのオリゴヌクレオチド（フラグメント1から8）を作製し、PCR 反応によって得られたものである。作製した上記オリゴヌクレオチドは、センス側およびアンチセンス側の各4種類（計8種類）であり、アニーリングする部分10塩基分をオーバーラップするよう設計したものである。

なお、フラグメント1は配列番号4、フラグメント2は配列番号5、フラグメント3は配列番号6、フラグメント4は配列番号7、フラグメント5は配列番号8、フラグメント6は配列番号9、フラグメント7は配列番号10、フラグメント8は配列番号11としてそれぞれ例示した。

具体的な方法としては、フラグメント2から7（それぞれ50pmol）と T4 polynucleotide Kinase (10U/20 $\mu$ l) を含む反応液 (50mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, 0.5mM ATP) とを 37℃、30 分間反応させることにより、5'末端のリン酸化を行なった。反応後のサンプルを、フェノール/クロロホルム/

イソアミルアルコール (PCI) で抽出し、エタノール沈殿にて回収した。次に、各フラグメントを混合し、アニーリング反応を行なった。アニーリングには、フラグメント 1 および 8 (それぞれ 10pmol) と上記リン酸化処理を行なったフラグメント 2 から 7 (それぞれ 10pmol) とを含む反応液 (10mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 50mM NaCl) を混合し、このサンプルをサーマルサイクラーにセットし反応を行なった。この反応の条件プログラムは、95℃で 5 分間の熱変性を行ない、次に 90 分間で 25℃に下がるようにプログラム設定してアニーリング反応を行なった。この反応により 2 本鎖 DNA が作製され、これを鋳型 DNA として、PCR 反応を行なった。PCR 反応は、前記の鋳型 DNA (1μl)、センスプライマーとアンチセンスプライマー (各 0.4μM) を含む反応液 (10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin, 200μM dNTP, 1.25U/50μl Ampli Taq Gold) で行なった。なお、センスプライマーとしては、LIC-forward primer (配列番号 1 2) を、アンチセンスプライマーとしては、LIC-reverse primer (配列番号 1 3) をそれぞれ使用し、これらプライマーそれぞれには、発現ベクターに特異的な配列を付加している。

上記の PCR 反応によって、得られた PCR 産物は、TA Cloning Kit を用いてサブクローニングを行ない、得られたプラスミドの塩基配列にミスセンスがないことを DNA シークエンサーを用いて確認した (図示せず)。

#### <2>発現ベクターの作製

本実施例における発現ベクターは、S-Tag、His-Tag を含むチオレドキシンの融合タンパク質を発現する Ligation-independent cloning (LIC) Vector の pET32 Xa/LIC (Novagen 社製) を使用し、添付のプロトコールに従って作製したものである。上記 (I) にて得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、Suprec-01 (登録商標) で精製してエタノール沈殿で回収した。PCR 産物の LIC サイトの形成は、T4 DNA Polymerase の 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性を利用して、PCR 産物の 3' 末端からグアニン塩基 (G) の直前まで削った。すなわち、PCR 産物 (0.2pmol) と T4 DNA Polymerase (1U/20μl) を含む反応液 (50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM β-ME, 5mM DTT, 2.5mM dGTP) を混合し、22℃で 1 時間アニーリング反応を行なった。この反応液 1μl をコンピテントセル (E. coli

BL21 (DE3)、Novagen 社製) に公知の方法で形質転換し、形質転換した大腸菌株に目的とするローヤルゼリーペプチドをコードする遺伝子の有無を、コロニー PCR で確認した。

### <3>組換えタンパク質の発現および精製

- 5 上記<2>によって得られた、ローヤルゼリーペプチド遺伝子が導入された大腸菌株を LB Broth 3ml に植菌し、37℃で一晩の前培養を行なった。前培養後、この培養液 2ml を前培養で用いた培養液と同一の培養液 LB Broth 200ml に加え、37℃で 2 時間の培養を行なった。そして、最終濃度 1mM の IPTG を加えてさらに 37℃で 3 時間培養し、遺伝子発現の誘導を行なった。その後、菌体は PMSF (最終
- 10 濃度 0.625  $\mu$ g/ml) を含む PBS 中でポリトロン型ホモジナイザー (ultra-turrax T8, IKA) を用いて抽出し、25000 $\times$ g、20 分間で遠心分離を行なって上清を回収し抽出画分を得た。この抽出画分から融合タンパク質 (すなわち、ローヤルゼリーペプチドを含む) の精製は、この融合タンパク質に付加されている His-Tag を利用して行なった。具体的には、His-Tag と結合する Ni イオンを固定化された樹脂に
- 15 よる金属キレートアフィニティークロマトグラフィーで精製を行なった。アフィニティー樹脂は、Ni-NTA Agarose (Qiagen 社製) を使用し、パッチ法で精製した。PBS で平衡化した Ni-NTA Agarose に抽出画分を加え、低温条件下で穏やかに混合して樹脂に結合させた。次に、700 $\times$ g、3 分間で遠心分離を行なって上清を除去し PBS で樹脂を洗浄し、さらに樹脂と非特異的に結合しているタンパク質を溶出
- 20 するため、0.05M Imidazole を含む PBS を加えて樹脂を洗浄した。続いて、0.5M Imidazole を含む PBS を加えて低温条件下で穏やかに混合し、目的とする融合タンパク質を溶出した。そして、溶出した融合タンパク質を 700 $\times$ g で 3 分間の遠心分離を行って上清を回収し、この上清を限外濾過 (Ultrafree-4 centrifugal filter unit, MWCO 10000, Millipore 社製) で酵素処理用バッファー (50mM
- 25 Tris-HCl (pH8.0)、100mM NaCl、1mM  $\text{CaCl}_2$ ) に置換した。そして、融合タンパク質 1mg 当たり、Factor Xa (Protein Engineering Technology Aps) 5  $\mu$ g を加え、37℃で 24 時間の消化反応させた。

上記のとおり消化させた反応液は、逆相クロマトグラフィー用カラム (RESOURCR RPC 3ml, Pharmacia Biotech 社製) を接続した高速液体クロマトグ

ラフィー（HPLC）システムで精製した。0.1%TFA で平衡化したカラムにサンプルを注入し、流速 1ml/min. で 0.1%TFA を含むアセトニトリルの濃度勾配で溶出させた。検出には、紫外分光光度計検出器で波長 215nm における吸光度を測定し、その吸光度の変化をレコーダーに記録した。

- 5 結果は、図 8 に例示したとおりであった。また、図中の水平バーのピークを、トリシン SDS-PAGE で分析し、目的とするローヤルゼリーペプチドが単離されたことを確認した。

#### 実施例 7：ローヤルゼリーペプチド（アピシミン）の機能解析

##### 10 <1>女王蜂への分化誘導効果

実施例 6 で得られたローヤルゼリーペプチドを用いて、機能解析を行なった。具体的には、既存のミツバチ人工飼育方法に従って、ミツバチを飼育した。その際に、人工餌料中に 1 頭あたり 500ng の前記のローヤルゼリーペプチドを添加して与えた。一方、対照区としてはローヤルゼリーペプチドの代わりに、ウシ血清

15 アルブミンを使用した。

結果は、表 1 に示したとおりである。幼虫から成虫化率は 20%程であったが、ローヤルゼリーペプチドを摂取させた幼虫の内、中間体を出現させることができた。このことから、この出願の発明のローヤルゼリーペプチドは、女王蜂への分化誘導における補助的な機能を有する因子であることが考えられる。

表 1

	1 齢幼虫数	終齢幼虫数	蛹数	成虫数	女王	カースト 中間体	働きバチ
対照区 (ウシ血清アルブミン)	24	14	9	2	0	0	2
組換え体ペプチド	24	14	8	4	0	1	3

## <2>免疫賦活試験

### (a) 実験動物と培地組成

実験動物は、ICR 系マウス（雌、日本 SLC）を用いた。

また、培地は、10%ウシ胎児血清 (FCS)、2mM L-グルタミン、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、100 Units/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含む RPMI 培地（日水製薬社製）を使用し、5% CO<sub>2</sub>、37℃、湿潤の条件下で培養した。

### (b) 細胞浮遊液の調整

細胞浮遊液の調整は、以下のステップで行なった。

すなわち、ジエチルエーテルで麻酔したマウスを頸椎脱臼して固定した後、解剖用ハサミとピンセットを用いて脾臓を摘出して、PBS (-) (137mM NaCl、2.7mM KCl、2mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) を 10ml 入れたディッシュへ移した。ディッシュ内で、脾臓をホモゲナイズし、これを金属メッシュを用いて 50ml チューブ (FALCON 社製) 内へろ過して細胞液として調整した。これを 1100rpm、10 分間で遠心分離を行い、トリス塩化アンモニウム溶液 (0.14M 塩化アンモニウム、1.7mM Tris-HCl (pH 7.65)) を 5ml 加えて、5 分間のインキュベーションをした。この操作を 2 回繰り返して、赤血球を除去した。

次いで、洗浄のための PBS (-) を 30ml 加えて、1100rpm、10 分間で遠心分離を 2 回繰り返して、上清を取り除いた。そして、上記 (a) の RPMI 培地 40ml を加え、フラスコに移して、CO<sub>2</sub> インキュベーター（和研薬社製）内で、37℃、2 時間でインキュベートし、フラスコ内の上清を新しいチューブに移したものをリンパ細胞浮遊液とした。

調整した上記のリンパ細胞浮遊液は、0.4%トリパンブルー溶液で染色し、ブルケルチュク血球計算板を用いて細胞数を計測し、細胞数が  $1 \times 10^6$  細胞/ml となるよう培地で調整したものを、免疫の活性試験に用いた。

### (c) 免疫賦活試験

上記<2> (b) で調整したリンパ細胞浮遊液を 96 穴マイクロプレート (IWAKI 社製) に 100  $\mu$ l づつ入れ、リンパ細胞浮遊液の最終濃度が 1%となるようにジメチルスルホキシド (DMSO) で細胞液を溶解し、各ウェルに 11  $\mu$ l 添加した。これと同時に、免疫細胞（本実施例の場合は、リンパ球細胞）の代謝活性による還元

量を測定することができる alamar blue (登録商標) (和光純薬工業社製) を  $10\mu\text{l}$  づつ各ウェルに添加し、12 時間ごとに 4 日間、波長 590–620nm に設定したマイクロプレートリーダー (ナルジュヌンクインターナショナル社製) で吸光度の変化を測定し、リンパ球に対する各画分および単離化合物の影響を解析した。

- 5      結果は、図 9 に示したとおりである。ローヤルゼリーペプチドを添加していない場合と添加した場合とを比較することにより、この出願の発明のローヤルゼリーペプチドの効果が顕著に現れていることが確認することができた。

図中の黒菱形は無添加のコントロール、黒丸はポジティブコントロールのリボ  
10      ポリサッカライド (LPS) を  $3\mu\text{g/ml}$  添加したもの、黒四角は組換えローヤルゼ  
りーペプチドを  $3\mu\text{g/ml}$  添加したもの、黒三角は組換えローヤルゼリーペプチド  
を  $6\mu\text{g/ml}$  添加したものをそれぞれ示している。

実施例 8 : 抗ローヤルゼリーペプチド抗体を用いた女王蜂への分化誘導の阻止

#### <1>抗ローヤルゼリーペプチド抗体の作製

- 15      図 3 および図 4 に例示した、ローヤルゼリーペプチドのアミノ酸配列 (配列番号 14 ~ 配列番号 17) に基づいて、24 番から 35 番のアミノ酸配列を利用し、  
抗原となり得るペプチド「CSIVSGANVSAVL」を合成した。この合成ペプチドを抗  
原として、通常の方法で抗体作製をするため、ウサギ 2 羽 (品種: JW クリーン)  
に  $1\text{mg/回}$  を投与して、免疫感作実験を行なった。この免疫感作実験開始 5 週か  
20      ら 7 週間に、追加免疫を実施しながら試料採血し、ELISA で抗体価を調査しながら最終的に全血採血し、この血清を次の実験に供した。

#### <2>抗原ペプチドを用いた Affinity 精製法

20ml の血清の 40% 硫酸沈殿物を、20mM リン酸と 150mMNaCl Buffer (pH7.4) で透析し、 $0.45\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し、精製用サンプルとした。

- 25      HNS-activated Sepharose 4FF 担体約 2ml に抗原ペプチド約 10mg を結合させて、Affinity カラムを作製した。平衡化 Buffer (20mM リン酸、150mMNaCl Buffer (pH7.4)) を流し、サンプルをアプライして、カラム内を 2 時間平衡化 Buffer で循環し、その後ベースラインに戻るまで平衡化 Buffer を流した。溶出 Buffer (100mM クエン酸-NaOH、(pH3.0)) で血清中の抗体を溶出した。

吸光度 280nm で溶出ピークを回収し、PBS (-) で透析して  $0.45\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し後に、6ml の精製物を得ることができた。総タンパク質量は  $355\mu\text{g}$  であった。

### <3>精製抗体を用いたウェスタンブロッティング

- 5 内勤働きバチから下咽頭腺を摘出し、そのタンパク質試料をトリシン SDS-PAGE で分離して、分離後のゲルは、セミドライ式プロテイング法で PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜は、ブロッキング剤として 5% スキムミルクを含む TBS-T に一晚浸漬してブロッキング処理を行なった。次に、TBS-T で洗浄後、上記<2>にて得られた精製抗体を抗体希釈液 (1% gelatin/TBS-T) で 100 倍希釈して、
- 10 一次抗体反応としてこの抗体溶液に PVDF 膜を浸漬し、室温で 1 時間反応させた。その後、TBS-T で再度洗浄し、二次抗体反応として、抗体希釈液で 2000 倍希釈した 2 次抗体 (Horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG ヤギ IgG) と室温で 1 時間反応させた。検出は、ECL (登録商標) を用いて化学発光させ、シグナルを X 線フィルムに露光させた。
- 15 結果は、図 10 に示したとおりであった。この図 10 に示したように、内勤働きバチからの下咽頭腺におけるタンパク質試料と、作製した抗体 (抗ローヤルゼリーペプチド抗体) におけるシグナルバンドが、分子量 5500 付近で観察された。すなわち、ローヤルゼリーペプチドの合成器官が、下咽頭腺であることが確認でき、またこの結果は、作製した抗体がローヤルゼリーペプチドに反応するものであることを明らかにすることができた。
- 20

### <4>女王蜂への分化誘導効果を阻止するローヤルゼリーペプチド精製抗体一

- 上記<1>~<3>で得られた精製抗体を用いて、既存のミツバチ人工飼育法に従って、ミツバチを飼育した。ここでは、人工飼料中のローヤルゼリー抽出画分区 (ローヤルゼリーから分子量 100~10000 の抽出画分を 50mg/7ml に調整したもの) をポジティブコントロールとし、対照区には牛血清アルブミン (50mg/7ml)
- 25 を使用した。ローヤルゼリーペプチドの抗体区としては、ポジティブコントロールとしたローヤルゼリーから分子量 100~10000 の抽出画分 50mg を 7ml に調整し、これに抗体  $20\mu\text{g}$  添加したものを使用した。結果は、表 2 に示した。

表 2

	1 齢幼虫数	終齢幼虫数	成虫数	女王バチ	中間体	働きバチ
対照区 (牛血清アルブミン 50mg/7ml)	48	34	6	0	3	3
ローヤルゼリー抽出画分区 (分子量100~10,000のペプ チド画分 50mg/7ml)	24	20	4	1	3	0
ローヤルゼリーペプチド抗体 区 (上記抽出画分50mg/7ml +抗体20 $\mu$ g/7ml)	24	24	7	0	6	1

- この表 2 に示したように、対照区では幼虫からの成虫化率は 13% 程度、ローヤ
- 5    ルゼリー抽出画分区では 17% 程度、ローヤルゼリーペプチド抗体区では 29% で
- あった。それぞれの成虫化したものの内、対照区では、中間体と働きバチの出現
- は 50% であった。ポジティブコントロールのローヤルゼリー抽出画分区では、
- 25% が女王蜂で、75% が中間体となり働きバチはまったく出現しなかった。ロー
- ヤルゼリーペプチド抗体区では、女王蜂の出現は観察されず、中間体が 86% で
- 10    働きバチの出現も 14% となった。

- この結果は、ローヤルゼリー抽出画分の 0. 04% (20 $\mu$ g÷50mg) のような低濃
- 度のローヤルゼリーペプチド抗体を人工飼料中に添加することで、女王蜂誘導を
- 阻止する効果があることを示している。したがって、この結果によって、ローヤ
- ルゼリーペプチドが女王蜂への分化誘導における補助的な機能を有する因子で
- 15    あることを改めて確認できた。

#### 産業上の利用可能性

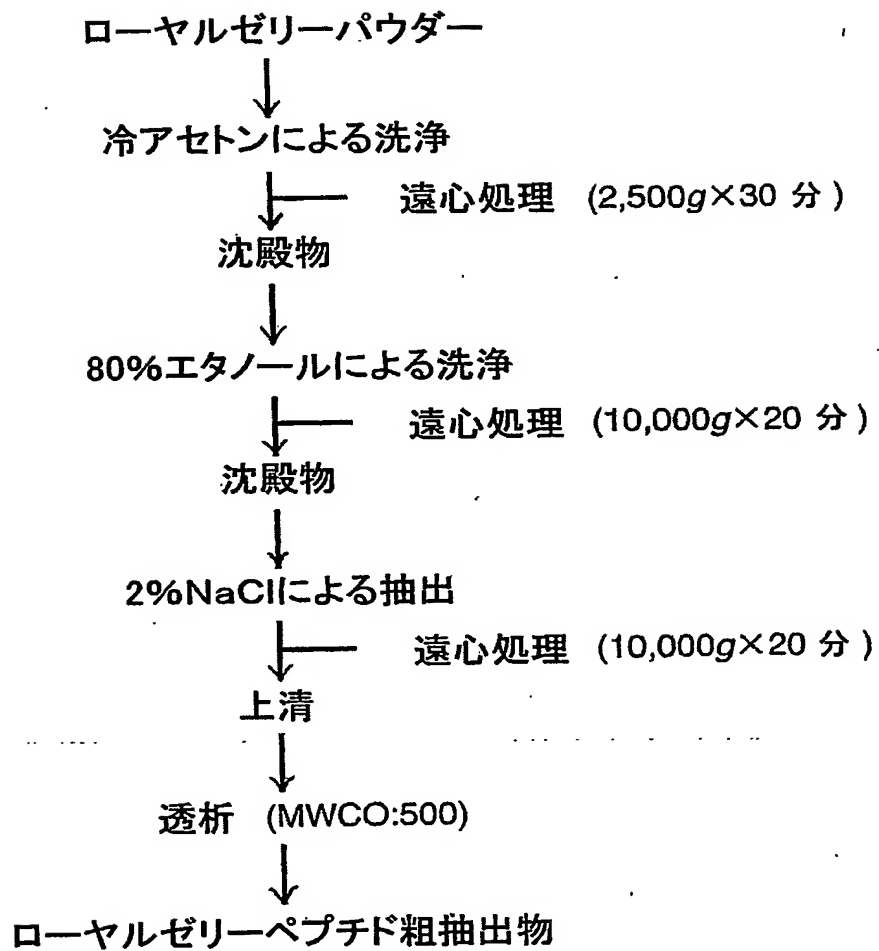
- 以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、女王蜂の誘導補助因子
- としての機能を有し、また動物の生体防御系の向上 (免疫力の賦活効果) を実現
- 20    することのできるローヤルゼリーペプチドおよびこれを含有する組成物が提供
- される。

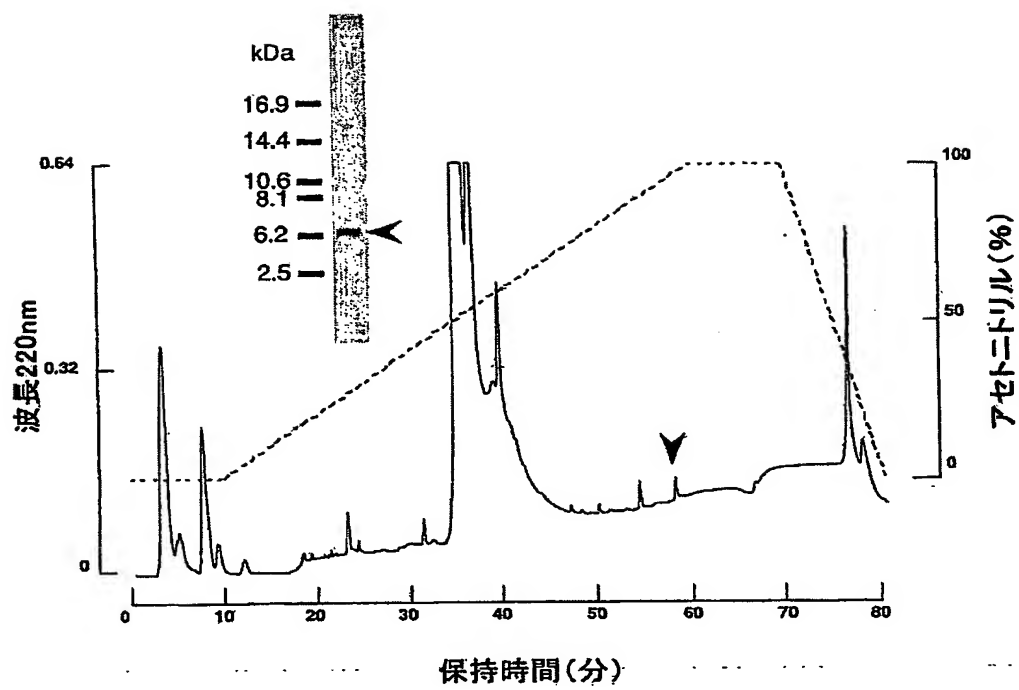


## 請求の範囲

1. 女王蜂分化誘導補助因子としての機能および動物の免疫力賦活因子としての機能の少なくともいずれかの機能活性を有することを特徴とするローヤルゼリーペプチド。
2. 請求項1のローヤルゼリーペプチドをコードする遺伝子配列を有する発現カセットを備えた発現ベクター。
3. 請求項2の発現ベクターによって、形質転換された形質転換細胞。
4. 請求項3の形質転換細胞から産生されるローヤルゼリーペプチド。
5. 請求項1または4のローヤルゼリーペプチドを有効成分として含有する組成物であって、ミツバチの女王蜂分化誘導補助効果を向上させる機能および動物の免疫力賦活効果を向上させる機能の少なくともいずれかの機能を有することを特徴とする組成物。
6. 請求項5の組成物をミツバチの幼虫に投与することにより、幼虫の成長を促進し、女王蜂への分化を誘導させることを特徴とするミツバチの女王蜂への誘導方法。
7. 請求項5の組成物を動物に投与することにより、動物の免疫力賦活効果を向上させることを特徴とする動物の免疫力賦活方法。
8. 請求項1のローヤルゼリーペプチドをコードする遺伝子配列を導入した非ヒト生物の初期胚、受精卵および胚幹細胞いずれかを個体発生して得られる非ヒト生物およびその子孫生物であって、体細胞染色体中に上記遺伝子を保有し、ローヤルゼリーペプチドを発現することを特徴とするトランスジェニック生物。
9. 非ヒト生物が、植物または動物のいずれかであることを特徴とする請求項8の非ヒト生物。
10. 動物が、昆虫類であることを特徴とする請求項9の非ヒト生物。
11. 昆虫類が、カイコであることを特徴とする請求項10の非ヒト生物。

1 / 1 0  
図 1



2/10  
図2

3 / 1 0  
☒ 3

1 10 20 30  
N-KTSISVKGES NVDVVSQINS LVSSIIVSGAN  
40 50  
VSAVLLAQTL VNILQIXIDA NVFA .....

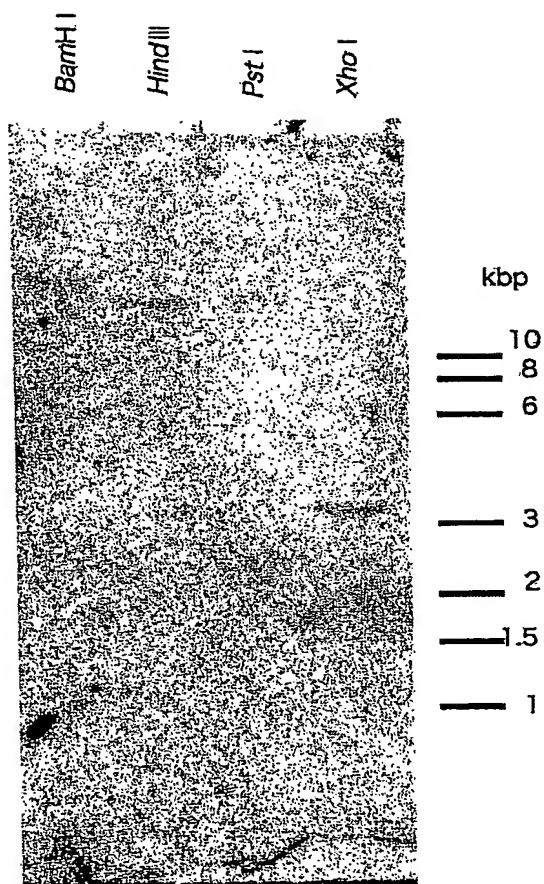
**图 4**


```

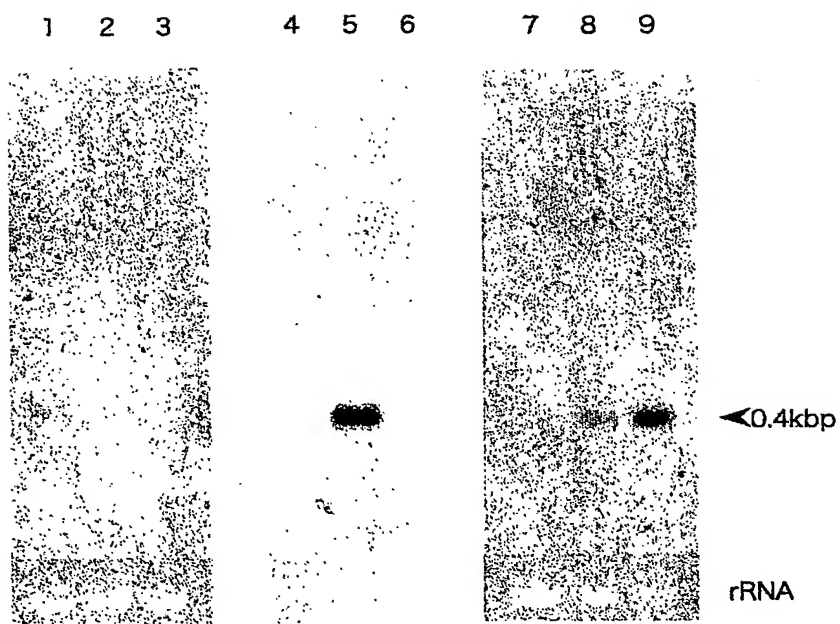
1 ATCGAACCGAGCTTTCTAAAAGCAATTCCAAACAGCACAAAAATCAAA ATG AGC AAA 57
                                                                M S K -22
58 ATC GTT GCT GTC GTC GTC CTA GCT GCC TTC TGC GTA GCC ATG TTG 102
-21 I V A V V V L A A F C V A M L -7
103 GTC AGC GAT GTG TCC GCC AAA ACA TCA ATC AGT GTC AAA GGC GAA 147
-6 V S D V S A K T S I S V K G E 9
148 TCG AAC GTG GAT GTC GTT TCC CAA ATC AAC AGT TTG GTT TCA TCT 192
10 S N V D V V S Q I N S L V S S 24
193 ATC GTG TCT GGT GCC AAC GTG TCA GCA GTA CTC CTA GCT CAA ACT 237
25 I V S G A N V S A V L L A Q T 39
238 TTA GTT AAT ATC CTG CAA ATT CTT ATC GAC GCT AAT GTT TTC GCT 282
40 L V N I L Q I L I D A N V F A 54
283 TAA TTTATATATTCTTTAGCTTTGTATTGCGGCATACAACGCATTCGAA TAAAGTAA 340
*
341 TTAATAAAATTCAGAAAAAAA 377

```

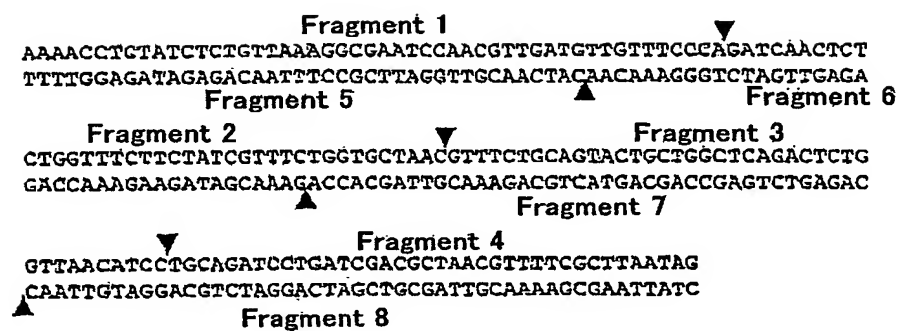
5 / 1 0  
 図 5



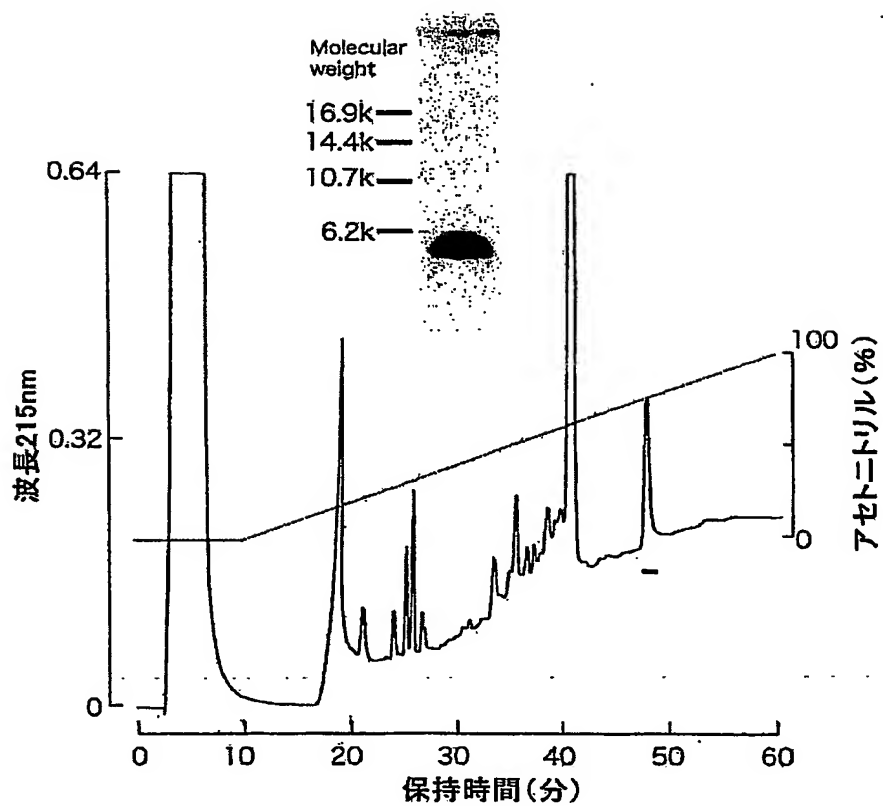
6/10  
 6

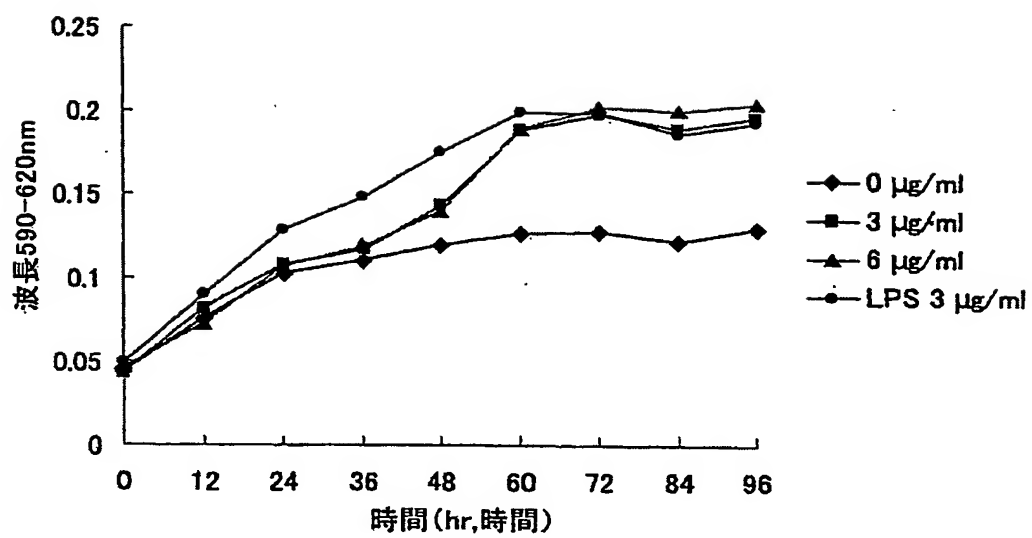


7/10  
図 7

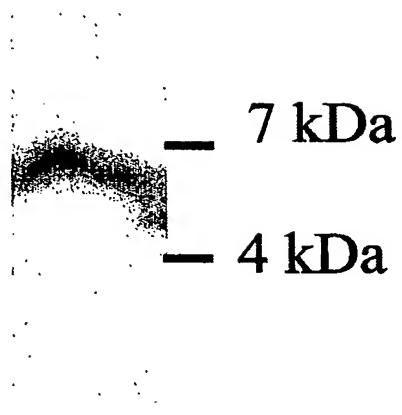




8/10  
図 8

9/10  
図9

10/10  
☒ 10



## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> Royal Jelly Peptide

<130> 04F039PCT

<150> JP 2003-338665

<151> 2003-09-29

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer 1

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1).. (37)

<223> i

<400> 1

aaracnwsna thwsngtnaa rggngarwsn aaygtng

37

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer 2

<400> 2

cgttggcacc agacacgata gatgaaacc

29

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer 3

<400> 3

tttctgaatt ttattaatta ctttattcg

29

3/11

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fragment 1

&lt;400&gt; 4

aaaacctcta tcctgttaa aggcgaatcc aacgttgatg ttgtttccca

50

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fragment 2

&lt;400&gt; 5

gatcaactct ctggtttctt ctatcgttcc tggctgaac

40

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

4/11

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fragment 3

&lt;400&gt; 6

gtttctgcag tactgtggc tcagactctg gttaacatcc

40

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fragment 4

&lt;400&gt; 7

tcagatcct gatcgacgt aacgttttcg cttaatag

38

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fragment 5

5/11

&lt;400&gt; 8

ttttggagat agagacaatt tccgcttagg ttgcaactac

40

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fragment 6

&lt;400&gt; 9

aacaaagggc ctagttgaga gaccaaagaa gatagcaaag

40

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fragment 7

&lt;400&gt; 10

accacgattg caaagacgtc atgacgaccg agtctgagac

40



6/11

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fragment 8

&lt;400&gt; 11

caattgtagg acgtctagga ctagctgcga ttgcaaaagc gaattatc

48

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; LIC Forward

&lt;400&gt; 12

ggtattgagg gtcgcaaaac ctcctatctct g

31

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

7/11

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; LIC Reverse

&lt;400&gt; 13

agaggagagt tagagcccta ttaagcgaaa acg

33

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 162

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; bee

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1).. (162)

&lt;223&gt; unknown

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (162)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 14

aaa aca tca atc agt gtc aaa ggc gaa tcg aac gtg gat gtc gtt tcc

48

Lys Thr Ser Ile Ser Val Lys Gly Glu Ser Asn Val Asp Val Val Ser

8/11

1

5

10

15

caa atc aac agt ttg gtt tca tct atc gtg tct ggt gcc aac gtg tca 96

Gln Ile Asn Ser Leu Val Ser Ser Ile Val Ser Gly Ala Asn Val Ser

20

25

30

gca gta ctc cta gct caa act tta gtt aat atc ctg caa att nnn atc 144

Ala Val Leu Leu Ala Gln Thr Leu Val Asn Ile Leu Gln Ile Xaa Ile

35

40

45

gac gct aat gtt ttc gct

162

Asp Ala Asn Val Phe Ala

50

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; bee

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (47).. (47)

<223> The 'Xaa' at location 47 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,  
Met, Xaa, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,  
Cys, or Phe.

&lt;400&gt; 15

9/11

Lys Thr Ser Ile Ser Val Lys Gly Glu Ser Asn Val Asp Val Val Ser

1 5 10 15

Gln Ile Asn Ser Leu Val Ser Ser Ile Val Ser Gly Ala Asn Val Ser

20 25 30

Ala Val Leu Leu Ala Gln Thr Leu Val Asn Ile Leu Gln Ile Xaa Ile

35 40 45

Asp Ala Asn Val Phe Ala

50

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 162

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; bee

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (162)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 16

10/11

aaa aca tca atc agt gtc aaa ggc gaa tcg aac gtg gat gtc gtt tcc 48

Lys Thr Ser Ile Ser Val Lys Gly Glu Ser Asn Val Asp Val Val Ser

1 5 10 15

caa atc aac agt ttg gtt tca tct atc gtg tct ggt gcc aac gtg tca 96

Gln Ile Asn Ser Leu Val Ser Ser Ile Val Ser Gly Ala Asn Val Ser

20 25 30

gca gta ctc cta gct caa act tta gtt aat atc ctg caa att ctt atc 144

Ala Val Leu Leu Ala Gln Thr Leu Val Asn Ile Leu Gln Ile Leu Ile

35 40 45

gac gct aat gtt ttc gct 162

Asp Ala Asn Val Phe Ala

50

<210> 17

<211> 54

<212> PRT

<213> bee

<400> 17

Lys Thr Ser Ile Ser Val Lys Gly Glu Ser Asn Val Asp Val Val Ser

1 5 10 15

11/11

Gln Ile Asn Ser Leu Val Ser Ser Ile Val Ser Gly Ala Asn Val Ser

20

25

30

Ala Val Leu Leu Ala Gln Thr Leu Val Asn Ile Leu Gln Ile Leu Ile

35

40

45

Asp Ala Asn Val Phe Ala

50

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014544

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, A01H5/00, A01K67/027, A01K67/033

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, A01H5/00, A01K67/027, A01K67/033

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ, CAPLUS/REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Bilikova K., Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee ( <i>Apis mellifera</i> L.) royal jelly: purification and molecular characterization, FEBS Lett., 2002, Vol.528, pages 125 to 129	1-4, 8-11
A	JP 5-76253 A (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 30 March, 1993 (30.03.93), Full text (Family: none)	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22 October, 2004 (22.10.04)

Date of mailing of the international search report  
09 November, 2004 (09.11.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/00, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, A01H5/00, A01K67/027, A01K67/033

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/00, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, A01H5/00, A01K67/027, A01K67/033

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI(DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ, CAPLUS/REGISTRY(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Bilikova K., Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee ( <i>Apis mellifera</i> L.) royal jelly: purification and molecular characterization, FEBS Lett., 2002, Vol. 528, p. 125-129	1-4、 8-11
A	JP 5-76253 A (住友化学工業株式会社) 1993.03.30; 全文 (ファミリーなし)	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」出願による開示、使用、展示等に関する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せにより進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.10.2004

国際調査報告の発送日

09.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高畑 栄二

4B

3227

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**